

551,867

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2004 年 10 月 21 日 (21.10.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/090517 A1

- (51) 国際特許分類<sup>7</sup>: G01N 21/64
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/004630
- (22) 国際出願日: 2004 年 3 月 31 日 (31.03.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-101609 2003 年 4 月 4 日 (04.04.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人産業技術総合研究所 (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE AND

TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒1008921 東京都千代田区霞ヶ関一丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP).

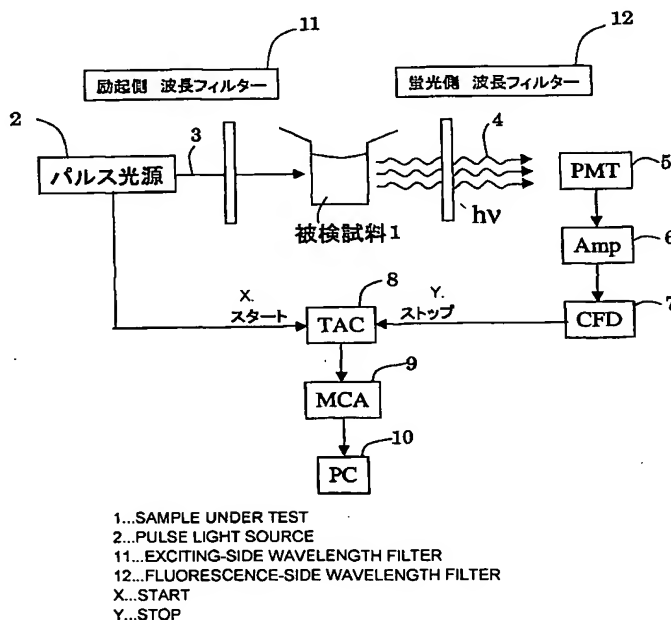
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鈴木 英之 (SUZUKI, Hideyuki) [JP/JP]; 〒3058562 茨城県つくば市東 1 丁目 1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくば中央第 4 内 Ibaraki (JP). 宮本 延明 (MIYAMOTO, Nobuaki) [JP/JP]; 〒3058562 茨城県つくば市東 1 丁目 1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくば中央第 4 内 Ibaraki (JP). 竹村 太郎 (TAKEMURA, Taro) [JP/JP]; 〒3058562 茨城県つくば市東 1 丁目 1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくば中央第 4 内 Ibaraki (JP). 西田 大輔 (NISHIDA, Daisuke) [JP/JP]; 〒3058562 茨城県つくば市東 1 丁目 1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくば中央第 4 内 Ibaraki (JP).

[続葉有]

(54) Title: QUANTITATIVE REAGENT, METHOD AND EQUIPMENT OF SUBSTANCE UTILIZING FLUORESCENCE LIFE-TIME

(54) 発明の名称: 蛍光寿命を利用した物質の定量用試薬、方法及び装置



(57) Abstract: A method for detecting a fluorescent molecule in a sample under test characterized by comprising (a) a step for measuring time-dependent fluorescence intensity of each of a plurality of kinds of fluorescent molecule having an inherent fluorescence lifetime, and (b) a step for comparing the fluorescence intensities thus measured.

(57) 要約: 被検試料中の蛍光分子を検出する方法であって、以下のステップ: (a)固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定するステップ、及び(b)前記測定された蛍光強度を比較するステップを含むことを特徴とする前記方法。

WO 2004/090517 A1



(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 蛍光寿命を利用した物質の定量用試薬、方法及び装置

## 5 技術分野

本発明は、試料中に存在する特定の蛍光分子の定量用試薬、定量方法、定量装置及びその解析方法に関する。

## 背景技術

- 10 被検試料中に存在する蛍光を標識した物質の濃度や混合比の測定は、近年主に蛍光分子の蛍光強度を計測することによって行われてきている。すなわち、濃度既知の蛍光分子（以下「参照蛍光分子」という）を被検試料中に入れ、検出の対象となる蛍光分子と参照蛍光分子との蛍光強度を比較することにより、濃度や混合比が未知の蛍光分子を定量することができる。こうした蛍光強度を利用する方法を適用すると、蛍光分子をプローブやターゲットとなる分子に標識し、その強度を比較することにより、ターゲットとなる遺伝子の発現量や一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism、SNP) のタイプを判別することが可能であるため、DNA マイクロアレイ、タックマン法、インベーター法として工業的に応用され、現在広く使われている。例えば、特表平 8-510562 号公報には、2種類の蛍光分子を用い、その蛍光強度を比較することによって、PCR によって増幅された核酸の量をモニターする検出方法が開示されている。
- 15
- 20

- 一方、蛍光分子に固有の蛍光寿命は、蛍光分子の周囲の環境や化学反応の度合いにあまり影響を受けないと考えられていたことから、これまで利用されることが少なかったが、近年可視光領域において高出力のレーザーやレーザーダイオードが開発され、また電子回路の処理速度が高速化し測定精度が向上したことから、バイオ分野にも積極的に使われるようになってきた。例えば、特開平 6-66802 号公報には、光ルミネセンスエネルギーの移転がみかけの蛍光寿命に現れることを利用して、免疫反応の反応生成物の存在量を定量する発明が紹介されている。ま
- 25

た、特表 2002-542453 号公報には「生物学的系についての蛍光分析法」が示されており、供与体と受容体との間に起こる蛍光共鳴エネルギー転移によって蛍光の調節寿命および相寿命が変化することにより、受容体の内部成長度をモニターすることができる測定方法が記載されている。

5

#### 発明の開示

現在普及している被検試料、特に核酸の定量あるいは同定は、PCR 法、LAMP 法、ICAN 法などによって増幅された試料を、蛍光分子で標識し、その蛍光強度を検出することによって実施されている。しかしながら、被検試料の増幅や同定  
10 には、長い作業時間と高コストの試薬を必要とすることから、簡便で、低コストの検出方法が求められている。

本発明は、蛍光分子の検出方法、検出用試薬、定量装置及び解析方法を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、蛍光分子の蛍光  
15 寿命に着目し、蛍光強度の減衰を時間依存的に測定することにより、簡便かつ低コストで検出し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 被検試料中の蛍光分子を検出する方法であって、以下のステップ：

(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間  
20 依存的に測定するステップ、及び

(b) 前記測定された蛍光強度を比較するステップ、  
を含むことを特徴とする前記方法。

(2) 被検試料中の測定対象物質を検出する方法であって、以下のステップ：

(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子で測定対象物質を標識するス  
25 テップ、

(b) 前記標識した蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定するステ  
ップ、及び

(c) 前記測定された蛍光強度を比較するステップ、

を含むことを特徴とする前記方法。

(3) 被検試料中の測定対象物質のタイプを判別する方法であって、以下のステップ：

(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子で測定対象物質を標識するステップ、

(b) 前記標識した蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定するステップ、

(c) 前記測定された蛍光強度を比較するステップ、

(d) 前記比較された強度比を用いて前記測定対象物質のタイプを判別するステップ、

を含むことを特徴とする前記方法。

(4) 上記(1)～(3)記載の方法において、複数種類の蛍光分子は、例えば固有の蛍光寿命として 0.01 以上～1.0ns 未満を持つグループ、1.0 以上～2.0ns 未満を持つグループ、2.0 以上～3.0ns 未満を持つグループ、3.0 以上～4.0ns 未満を持つグループ、4.0 以上～5.0ns 未満を持つグループ、5.0 以上～6.0ns 未満を持つグループ、6.0 以上～7.0ns 以下を持つグループからなる群から選択される異なる 3 つ以上のグループの各グループに属するものを使用することができる。また、蛍光分子の蛍光寿命は、互いに 1.0ns 以上異なるか、あるいは互いに 1.1 倍以上異なるものであり、これらの蛍光分子を 3 つ以上含んでいることが好ましい。これらの蛍光分子の蛍光寿命は、例えば 30ns 以下である。また、蛍光分子の少なくとも 1 種、又は測定対象物質の少なくとも 1 種は、既知の濃度を有するものを使用することができる。測定対象物質としては、プローブ又はターゲット（例えば核酸）などを例示することができる。

(5) 被検試料中の蛍光分子の解析方法であって、以下のステップ：

(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子の蛍光強度を時間依存的に測定し、次式 I：

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (I)$$

(式中、 $A_i$  は係数、 $t$  は時刻、 $\tau_i$  は蛍光寿命を表す。)

で示される蛍光寿命関数を作成するステップ、

(b) 前記関数を用いて蛍光強度を計算するステップ、

5   を含むことを特徴とする解析方法。

(6) 被検試料中の測定対象物質の解析方法であって、以下のステップ：

(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子で測定対象物質を標識するステップ、

(b) 前記標識した蛍光分子の蛍光強度を時間依存的に測定し、次式 I:

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (I)$$

10

(式中、 $A_i$  は係数、 $t$  は時刻、 $\tau_i$  は蛍光寿命を表す。)

で示される蛍光寿命関数を作成するステップ、

(c) 前記関数を用いて蛍光強度を計算するステップ、

を含むことを特徴とする解析方法。

15   上記(5)、(6)記載の解析方法において、蛍光強度は、係数  $A_i$  と蛍光寿命  $\tau_i$  との積を計算することにより算出される。

(7) 遺伝子の判別方法であって、以下のステップ：

(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子で被検試料中の遺伝子を標識するステップ、

20   (b) 前記標識した蛍光分子の蛍光強度を時間依存的に測定し、次式 I:

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (I)$$

(式中、 $A_i$  は係数、 $t$  は時刻、 $\tau_i$  は蛍光寿命を表す。)

で示される蛍光寿命関数を作成するステップ、

(c) 前記関数を用いて蛍光強度を計算することによって、当該蛍光分子の蛍光強度を検出するステップ、及び

(d) 前記蛍光強度を指標として遺伝子のタイプを判別するステップ、

5   を含むことを特徴とする前記方法。

また、蛍光強度は、係数  $A_i$  と蛍光寿命  $\tau_i$  との積を計算することにより算出される。

上記解析方法及び判別方法において、少なくとも 1 種の蛍光分子の蛍光寿命が既知のものを使用することが好ましい。

10   (8) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子を含む、測定対象物質の検出用試薬又はキット。

(9) 被検試料中の蛍光分子を検出する装置であって、以下の手段：

(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定する手段、及び

15   (b) 前記測定された蛍光強度を比較する手段、

を含むことを特徴とする前記装置。

(10) 被検試料中の測定対象物質の定量装置であって、以下の手段：

(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子で測定対象物質を標識する手段、

20   (b) 前記標識した蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定する手段、及び

(c) 前記測定された蛍光強度を比較する手段、

を含むことを特徴とする前記装置。

## 25   図面の簡単な説明

図 1 は、本発明で利用する単一光子計数法の測定原理及び測定装置を表す。

符号の説明

1 : 被検試料、   2 : パルス光源、   3 : パルス光、   4 : 蛍光、   5 : 光電

子増倍管、 6 : アンプ、 7 : 定フラクシヨンスクリミネータ、 8 : 時間-  
電圧変換器、 9 : マルチチャンネルアナライザ、 10 : パーソナルコンピュー  
タ、 11 : 励起側波長フィルター、 12 : 蛍光側波長フィルター。

図 2 は、本発明における 2 種類の蛍光分子の関係を説明するためのスペクトル  
5 を示す。F1ab と F1em はそれぞれ蛍光分子 F1 の規格化された吸収スペクトル  
と蛍光スペクトル、F2ab と F2em はそれぞれ蛍光分子 F2 の規格化された吸収  
スペクトルと蛍光スペクトルを示す。

図 3 は、波長と蛍光強度との関係を示す模式図である。

図 4 は、蛍光強度を時間軸に沿ってプロットした模式図である。

10 図 5 は、強度と時間との関係の蛍光減衰曲線を示す図である。

図 6 は、本発明における蛍光分子に由来する蛍光の蛍光減衰曲線の典型例を示  
す。(a) は表 1 の ID 3、(b) は ID 6 の場合にそれぞれ該当する。

図 7 は、本発明を SNP のタイピングに応用した場合に得られる蛍光減衰曲線  
を表す。

15 図 8 は、蛍光寿命の蛍光減衰曲線から得られる蛍光強度の比が直線的に変化す  
ることを示す図である。

図 9 は、サンプル C における蛍光の減衰曲線を表す。

図 10 は、実施例 4 における 4 種類の蛍光分子の蛍光スペクトルを示す。

図 11 は、サンプル C を励起した際の蛍光スペクトルを示す。

20 図 12 は、サンプル E における蛍光の減衰曲線を表す。

図 13 は、実施例 5 における 5 種類の蛍光分子の蛍光スペクトルを示す。

図 14 は、サンプル E を励起した際の蛍光スペクトルを示す。

### 発明を実施するための最良の形態

25 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明者らは、蛍光分子から発せられる蛍光強度が時間の経過により減衰する  
点に着目し、当該蛍光強度の減衰を時間依存的に測定することを考えた。そして、  
異なる蛍光寿命を持つ蛍光分子を含有する被検試料の蛍光強度の蛍光減衰曲線



(試料から発せられる蛍光強度の時間依存性)を単一光子計数法(「蛍光測定」木下一彦・御橋廣眞編、学会出版センター)により測定した。

本発明において、「蛍光寿命」とは、パルス励起光による蛍光強度  $I_0$  が  $1/e$  ( $e$  は自然対数の底を表す。)となるまでの時間を意味し、蛍光分子が固有に有する  
5 値である。例えば 5-カルボキシナフトフルオレセインは 0.65 ナノ秒 (nsec)、フルオレセインは 4.04 nsec である。

単一光子計数法は、光の最低単位である光子を 1 個 1 個検出する方法であるため、あらゆる光検出法の中で最も感度が高く、一般的に用いられる蛍光強度や吸光度に比較し、極微量の試料の蛍光寿命を、濃度に依存することなく安定的に測  
10 定するのに適している。例えば、図 1 に示すように、セル、チューブ、マイクロプレート等に入れた被検試料 1 (被検試料 1 中に測定対象物質が含まれている)にパルス光源 2 からパルス光 3 を照射し、被検試料 1 から発せられる蛍光 4 を光電子増倍管 (PMT: photomultiplier tube) 5 で検出する。光源 2 の波長及び光電子増倍管 5 で検出する光の波長は、フィルターまたは分光器により選択する。パ  
15 ルス光源 2 からの信号をスタート信号とし、光電子増倍管 5 からの信号をストップ信号としてアンプ 6、定フラクシオンデスクリミネータ (CFD: constant fraction discriminator) 7 を経由して時間-電圧変換器 (TAC: Time to Amplitude Converter) 8 に入力すると、光電子増倍管 5 で検出されるタイミングによって、TAC 8 の出力信号に差が出るため、これをマルチチャンネルアナライザ (MCA:  
20 Multi Channel Analyzer) 9 に取り込むことにより、蛍光寿命を測定することが可能である。出力信号は、パーソナルコンピュータ (PC) 10 のハードディスク等に保存される。

本発明においては、異なる固有の蛍光寿命を持つ複数種類 (ここでは 2 種類)の蛍光分子 F1 (蛍光寿命  $\tau_1$ ) と F2 (蛍光寿命  $\tau_2$ ) を用いて蛍光分子 F2 の濃  
25 度を測定する場合について説明する。

測定対象物質を蛍光分子等で標識し、その蛍光強度を測定すると、波長と蛍光強度との関係を曲線として得ることができる。まず、蛍光分子 F1 と F2 の吸収バンド (吸収スペクトル) を測定する。測定結果は、図 2 に示す曲線として得られ

る (F1ab, F2ab)。ここで、蛍光分子 F1 と F2 の吸収バンド (吸収スペクトル) は、利用する光源の波長と重なっていることが望ましい。但し、光源の波長より長波長領域に吸収バンドが存在しても、励起光の一部が蛍光分子に吸収されれば F1 及び F2 が蛍光を発することが可能である (図 2)。

- 5 実際の測定でレーザー光源を利用する場合には、蛍光分子 F1 と F2 の入った試薬を励起波長  $\lambda_{ex}$  で励起し、励起側波長フィルター 11 (図 1) として、減光フィルター (ND フィルター) を用いて励起光の強さを調整する。一方、蛍光側波長フィルター 12 (図 1) として、励起光が検出されないようロングパスフィルターを使用する。ただし、ロングパスフィルターの代わりに、特定の波長領域を選択  
10 するためのバンドパスフィルターや、ロングパスフィルターとショートパスフィルターを併用して使用してももちろん構わない (図 1)。

蛍光寿命  $\tau_1$  と蛍光寿命  $\tau_2$  が異なる場合に、被検試料中の測定対象物質の蛍光減衰曲線を測定する場合について説明する。

- 15 蛍光分子 F1 で測定対象物質を標識したときの蛍光強度の曲線が図 3 左側に示すように、また、蛍光分子 F2 で標識したときの蛍光強度の曲線が図 3 右側に示すように得られるものとする。そして、蛍光強度は時刻  $t_1$  から一定時間 ( $t_2, t_3$ ) の経過とともに (すなわち時間依存的に) 減衰し (図 3)、蛍光寿命  $\tau$  に至る。本発明においては、時間軸を新たに設定し、蛍光減衰曲線を得ることを試みた。すなわち、図 3 に示す座標に新たに時間軸を設けると、それぞれの時間において  
20 各蛍光強度の曲線を連続的に表示することができる (図 4)。蛍光強度のカウントとして便宜的に各曲線の頂点を結ぶと、図 4 に示す曲線 S1 が得られる (図 4 は、簡略のため F1 についての曲線 S1 のみを表示する)。

- そして、F1 及び F2 についてそれぞれ曲線 S1、S2 を求め、これを対数プロットすると、図 5 のパネル(a)に示す結果が得られる。この対数プロットを蛍光減衰  
25 曲線とする。図 5 のパネル(a)は、複数の測定対象を独立して測定したときの蛍光減衰曲線を同一のグラフに表したものである。複数の測定対象を同一の測定系において測定した場合は、蛍光減衰曲線は、図 5 のパネル(b)に示す曲線となる。このようにして得られる蛍光減衰曲線を指標として、蛍光分子がどの程度存在する

のか、その濃度を測定することができる。測定対象物質に蛍光分子を結合させて、測定対象物質を蛍光分子で標識した場合は、その測定対象物質の濃度が測定される。

- 5 一般には、異なる固有の蛍光寿命を有する  $i$  種類の蛍光分子を用いて蛍光減衰曲線を求める場合の蛍光寿命関数  $f(t)$  は、次式 I で表される。

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (\text{I})$$

$$= A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + A_3 \exp(-t/\tau_3) + \dots + A_k \exp(-t/\tau_k)$$

(式中、 $A_i$  は係数、 $t$  は時刻、 $\tau_i$  は蛍光寿命を表す。)

- 10 上記の蛍光寿命関数  $f(t)$  は、必要により、測定時のバックグラウンド (background) を加えた式 II (下記) で求めることができる。

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) + \text{background} \quad (\text{II})$$

$$= A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2) + A_3 \exp(-t/\tau_3) + \dots + A_k \exp(-t/\tau_k) + \text{background}$$

(式中、 $A_i$  は係数、 $t$  は時刻、 $\tau_i$  は蛍光寿命を表す。)

15

- 被検試料に含まれる蛍光分子の蛍光寿命とその強度は、測定された蛍光減衰曲線をデコンボリューションすることによって求められる。なお、デコンボリューションは、当業者において明らかである。その結果得られる係数  $A$  と蛍光寿命  $\tau$  の値から、各蛍光分子の蛍光強度の割合が  $(A_i \times \tau_i)$  (ここで  $i = 1, 2, 3, \dots$ ) に比例するため、その混合比を、 $(A_1 \times \tau_1) : (A_2 \times \tau_2) : (A_3 \times \tau_3) : \dots$  という方法で見積ることが可能である。そして被検試料に含まれる蛍光分子のうちの一つを参照蛍光分子とすれば、蛍光強度を比較することによって、濃度が未知の他の蛍光分子の濃度を求めることができる。

上記 2 種類の異なる蛍光寿命  $\tau_1$  と蛍光寿命  $\tau_2$  を有する蛍光分子を用いた場

合において、被検試料の蛍光減衰曲線を測定すると、後述の実施例に示すように図 6 のようなデータが観察される。そして、装置の応答関数  $g(t)$  と蛍光分子の持つ本質的な蛍光寿命関数  $f(t)$  との畳み込み積分である蛍光強度の減衰をデコンボリューションすることにより、係数  $A$  と被検試料に含まれる蛍光分子の蛍光寿命とを求める。その結果得られる係数  $A$  と蛍光寿命  $\tau$  の値から、その混合比は、  
5  $(A1 \times \tau 1) : (A2 \times \tau 2)$  により算出される。そして被検試料に含まれる蛍光分子のうちの一つを参照蛍光分子とすれば、蛍光強度を比較することによって、濃度が未知の他の蛍光分子の濃度を求めることができる。

本発明によれば、これまで蛍光スペクトルの重なりが大きいために同じ溶液中  
10 で同時に使用できなかった標識用の複数の蛍光分子でも、それぞれの蛍光寿命が少なくとも 1.1 倍以上、好ましくは 1.1~10 倍、より好ましくは 1.1~5 倍、さらに好ましくは 3~5 倍異なれば、その蛍光スペクトルに関係なく利用できることになり、検出を多重化（マルチプレックス）し、ハイスループットで測定する際にこれまでにないメリットを得ることができる。具体的な蛍光寿命の違いは、  
15 例えば 1.10 倍、1.32 倍、1.45 倍、1.79 倍、1.92 倍、1.95 倍、2.14 倍、2.77 倍、2.83 倍、3.43 倍、5.31 倍、5.40 倍、5.92 倍、6.22 倍、7.83 倍又は 9.49 倍の違いが挙げられるが、これらに何ら限定されるものではない。したがって、これまで蛍光強度を比較することによって解析していた多くのアプリケーションに対し、本発明で示されているような蛍光分子の組合せを適用し、生産性を向上することが可能である。このことは具体的には、蛍光側波長フィルターとしてバンドパス  
20 フィルターを使用すると、蛍光強度の時間依存性だけでなく、波長依存性も利用することができ、検出しようとする対象物質に対して同時に標識できるプローブの数を飛躍的に増大させることが可能になり、アッセイの高効率化とコスト削減を実現することができることを意味する。 $\tau 1$  と  $\tau 2$  との蛍光寿命の差（寿命比）  
25 は、上記の通り 1.1 倍以上であり、好ましくは 1.1~10 倍、より好ましくは 1.1~5 倍、さらに好ましくは 3~5 倍であるが、5 倍以上であっても、10 倍以上であってもよい。さらに、このような蛍光寿命を有する蛍光分子は、2 つ以上、好ましくは 3 個以上 13 個以下を同時に用いることができるが、同時に使用する蛍

光分子は 4 個以上 9 個以下、さらに好ましくは 5 個以上 7 個以下であることが、定量・定性分析を安定的に行う上では望ましい。

例えば、複数の蛍光分子が、固有の蛍光寿命として 0.01 以上～1.0ns 未満を持つグループ、1.0 以上～2.0ns 未満を持つグループ、2.0 以上～3.0ns 未満を持つグループ、3.0 以上～4.0ns 未満を持つグループ、4.0 以上～5.0ns 未満を持つグループ、5.0 以上～6.0ns 未満を持つグループ、6.0 以上～7.0ns 未満を持つグループからなる群のうち、異なる 3 つ以上のグループに属する蛍光分子であってもよい。蛍光分子の蛍光寿命は、30ns 以下であることが望ましい。あるいは、複数の蛍光分子の蛍光寿命の違いが互いに 1.0ns 以上異なる 3 個以上 13 個以下、好ましくは 4 個以上 9 個以下、さらに好ましくは 5 個以上 7 個以下の蛍光分子を用いることもできる。

このような蛍光寿命の測定に用いることが可能な蛍光分子として、例えば以下の色素等が挙げられる：

Cascade Yellow, Dapoxyl carboxylic acid, Pacific Blue, 7-Hydroxycoumarin-3-carboxylic acid, PyMPO, 5-carboxynaphthofluorescein, Dabcyl LysoSensor, Lucifer Yellow, Alexa Flour, NBD-X, DCCH, HEX, JOE, ROX, Texas Red, TET, TAMRA (米国インビトロジェン社製), Cy2, Cy3, Cy3B, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7 (アマシャムバイオサイエンス社製), FITC.

これらの蛍光分子は、本発明において測定対象物質を測定するためのキット又は試薬として使用される。キットには、上記蛍光分子のほか、緩衝液、使用説明書、部品などを含めてもよい。

以上の例では、異なる蛍光寿命を持つ蛍光分子が入った溶液中に存在する特定の蛍光分子の濃度を測定する方法を示したが、本発明の測定方法は、標識されたプローブまたはターゲット（例えば核酸、タンパク質、ペプチド、リガンド、レセプター、ドナー、ホルモン、糖鎖）の濃度同定や蛍光を発する微量物質の同定・検出に適用できる。また、種類の異なる測定物質（例えば遺伝子）の判別をすることも可能である。

そうした例として、DNA マイクロアレイ、タックマン法、インバーダー法等で

使用されている蛍光分子を、本発明で示されているような蛍光寿命の異なる複数の蛍光分子で置き換えることによって、マルチプレックス化し、ハイスループットで遺伝子等の測定対象物質を解析することが可能になる。図 7 には本発明を SNP のタイピングに応用した場合に得られる蛍光寿命の蛍光減衰曲線を表す。

5      上記図 6 では、蛍光分子を 408nm で励起しているが、用いる複数の蛍光分子の吸収スペクトルに即した波長、例えば 635nm で励起してもよい。また、408nm、635nm などの複数の波長で励起させることで、広範囲の吸収スペクトルを有するさまざまな蛍光分子を同時に用いることが可能となるため、さらに検出をマルチプレックス化できる。

10      上記例では、光源としてレーザーダイオード (LD) やレーザーを使用する場合について説明したが、それ以外にフラッシュランプや発光ダイオード (LED) を使ってももちろん構わない。

15      なお、本発明においては、パルス周波数、パルス強度、パルス径は、測定対象によって適宜選択することができる。例えば、パルス周波数は 1kHz~1GHz であり、パルス強度は数  $\mu$ W~数百 W である。また、パルス径は数十  $\mu$ m~数十 mm である。

さらに、本発明は、上述のように蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定する手段、及び蛍光強度を比較することで濃度を測定する手段を含む測定装置を提供する。

20

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は実施例に限定されるものではない。

実施例 1：異なる蛍光寿命を有する蛍光分子の定量測定

25      本実施例では、0.65ns ( $\tau_1$ ) の蛍光寿命を持つ 5-carboxynaphtofluorescein (以下「CNF」という) を F1 とし、4.04ns ( $\tau_2$ ) の蛍光寿命を持つフルオレセイン を F2 とし、前者を参照蛍光分子として両蛍光分子を含む被検試料の蛍光減衰曲線を図 1 の測定原理を使って測定し、蛍光強度の比を観察した。CNF の吸収スペクトルと蛍光スペクトルのピーク波長は、それぞれ 591 nm と 649nm で

ある。また、フルオレセインの吸収スペクトルと蛍光スペクトルのピーク波長は、それぞれ 494nm と 519nm である。

- 操作として蛍光分子 CNF およびフルオレセインが表 1 の割合で含まれるバッファー（組成：pH=7.6, 50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 30 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>）
- 5 溶液を調製し、その蛍光減衰曲線を測定した（図 6）。被検試料を波長 408nm の LD 光源で励起し、430nm のロングパスフィルターを使って、測定したところ、表 1 に示す結果が得られた。ここでは、CNF とフルオレセインそれぞれの単体が入った溶液からそれぞれに固有の蛍光寿命を求め、予め求めた蛍光寿命を利用して、フィッティング関数の係数  $B_i$ （ここで  $i = 1, 2$ ）を計算した。
- 10 この結果から明らかなように、CNF とフルオレセインの蛍光寿命の比が 6 倍以上 ( $6.2 < 4.04 / 0.65 < 6.3$ ) であるため、CNF とフルオレセインに由来する蛍光寿命の成分を分離することは容易であり、CNF に対するフルオレセインの濃度を変え
- ると、それに応じて、蛍光寿命の蛍光減衰曲線から得られる蛍光強度の比（表 1 中、「 $\log(\tau_{2B2}/\tau_{1B1})$ 」の値）が直線的に変化することが認められる（図 8）。
- 15 この結果を検量線として利用すると、濃度未知のフルオレセインが入った被検試料の蛍光減衰曲線を測定し、参照蛍光分子に対する濃度の割合を求めることによって溶液中のフルオレセインの濃度を特定することが可能である。図 8 から明らかなように、定量したいフルオレセインの濃度が約 3 桁変化しても直線性が維持
- 20 できることから、フルオレセインの濃度が 0.0015~0.5  $\mu$ M の範囲から外れる場合でも、参照蛍光分子の CNF の量を変えることによって、フルオレセインの濃度を特定することが可能である。また、濃度既知の 2 種類以上の参照蛍光分子を溶液中に混合することによって、フルオレセインの濃度検出範囲（ダイナミックレンジ）をさらに広げることも可能である。

表1 FITC 及び CNF 混合系の蛍光寿命とその割合

ID	測定条件				フィッティング結果							該当図
	CNF ( $\mu$ M)	FITC ( $\mu$ M)	FITC/CNF	log (FITC/CNF)	$\tau_1$ (ns)	$\tau_2$ (ns)	$B_1$	$B_2$	$\chi^2$	$\tau_2 B_2 / \tau_1 B_1$	log ( $\tau_2 B_2 / \tau_1 B_1$ )	
1	4	0			0.65				1.25			
2	4	0.0015	0.000375	-3.426	0.65	4.04	0.941	0.059	1.13	0.390	-0.409	
3	4	0.005	0.00125	-2.903	0.65	4.04	0.756	0.244	1.24	2.006	0.302	図6(a)
4	4	0.015	0.00375	-2.426	0.65	4.04	0.686	0.314	1.19	2.845	0.454	
5	4	0.05	0.0125	-1.903	0.65	4.04	0.527	0.473	1.22	5.579	0.747	
6	4	0.15	0.0375	-1.426	0.65	4.04	0.145	0.855	1.36	36.649	1.564	図6(b)
7	4	0.5	0.125	-0.903	0.65	4.04	0.124	0.876	1.31	43.909	1.643	
8	0	0.05				4.04			1.17			

※フィッティング結果は  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  を固定して two exponential でフィッティングしたものである。

※フィッティング関数:  $A[B_1 \exp(-t/\tau_1) + B_2 \exp(-t/\tau_2)]$  ( $B_1 + B_2 = 1$ )



実施例 2：異なる蛍光寿命を有する蛍光分子を利用したインベーター法による  
SNP（一塩基多型）のタイピング方法

実験操作として、初めに容量 200  $\mu$ L の PCR 用チューブにヒトのゲノム  
DNA(40 ng/ $\mu$ L)を 10  $\mu$ L 分注した。チューブを大気中に放置して溶媒を蒸発さ  
5 せた後、CNF とフルオレセインが標識された FRET プローブの入った Invader 法  
の試薬約 20  $\mu$ L を分注した。チューブを密閉した後、95°C で 5 分間 DNA を変  
性し、63°C の恒温槽中で 4 時間反応させ、反応終了後、被検試料を波長 408nm の  
LD 光源で励起し、430nm のロングパスフィルターを使って、被検試料から発せ  
10 られる蛍光の蛍光減衰曲線を図 1 の蛍光寿命測定の方法を使って測定し、SNP の  
頻度を解析（タイピング）した。その結果、蛍光減衰曲線から得られる（CNF の  
蛍光強度）/（フルオレセインの蛍光強度）から換算した（CNF の濃度）/（フル  
オレセインの濃度）の値が、ホモ接合体の試料に対しては、6～120、または 0.01  
～0.15 となり、ヘテロ接合体の試料に対しては、0.2～4 になった。この結果から  
15 明らかなように、異なる蛍光寿命を有する蛍光分子をタイピングする対象となる  
SNP の FRET プローブに対して標識することにより、ホモ接合体とヘテロ接合  
体の違いを判別することが可能である。

実施例 3：異なる蛍光寿命を有する蛍光分子を利用したタックマン法による  
SNP のタイピング方法

20 実験操作として、初めに容量 200  $\mu$ L の PCR 用チューブにゲノム DNA(40 ng/  
 $\mu$ L)を 10  $\mu$ L 分注した。チューブを大気中に放置して溶媒を蒸発させた後、CNF  
とフルオレセインが標識された TaqMan 法の試薬約 20  $\mu$ L を分注した。試薬を  
分注した後、サーマルサイクラーにて、95°C で 10 分間 DNA を変性し、(95°C で  
1 分、60°C で 3 分)というインキュベーションのサイクルを 40 回行った。反応終  
25 了被検試料を波長 408nm の LD 光源で励起し、430nm のロングパスフィルター  
を使って、被検試料から発せられる蛍光の蛍光減衰曲線を図 1 の蛍光寿命測定の  
原理を使って測定し、SNP の頻度を解析（タイピング）した。その結果、蛍光減  
衰曲線から得られる（CNF の蛍光強度）/（フルオレセインの蛍光強度）から換

算した (CNF の濃度) / (フルオレセインの濃度) の値が、ホモ接合体の試料に対しては、5~95、または 0.015~0.2 となり、ヘテロ接合体の試料に対しては、0.23~4.2 になった。この結果から明らかなように、異なる蛍光寿命を有する蛍光分子をタイピングする対象となる SNP のプローブに対して標識することにより、ホモ接合体とヘテロ接合体の違いを判別することが可能である。

#### 実施例 4：異なる蛍光寿命を有する複数の蛍光分子の定量測定

実験操作として、Pacific Blue、Lucifer Yellow、PyMPO、CNF が表 2 に示す割合で含まれるバッファー（組成：pH=7.6, 50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 30 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>）溶液 A、B、C を調製し、その蛍光減衰曲線を測定した。ここで、Pacific Blue、Lucifer Yellow、PyMPO、CNF それぞれの単体が入った溶液からそれぞれの蛍光分子に固有の蛍光寿命を求めたところ、それぞれ蛍光寿命として、3.45ns、6.17ns、1.80ns、0.65ns を持つことが判明した。Pacific Blue、Lucifer Yellow、PyMPO、CNF は、吸収スペクトルのピーク波長として、それぞれ 410nm、425nm、400nm、590nm を有する。また、蛍光スペクトルのピーク波長として、それぞれ 452nm、525nm、560nm、650nm を有する。

例として、表 2 のサンプル C を、分光器を用いて異なる 2 つの蛍光波長 (500nm、650nm) で測定した蛍光減衰曲線を図 9 に示す。分光器のバンド幅は 8nm であった。

図 10 には、Pacific Blue、Lucifer Yellow、PyMPO、CNF のそれぞれ単体を 408nm で励起した場合の規格化した蛍光スペクトルを示す。また、図 11 はサンプル C を 408nm で励起した際の蛍光スペクトルを表す。図 11 のように、4 種類の蛍光分子が混合されると蛍光スペクトルを使って分離したり、定量することは非常に難しくなる。

一方、表 2 から明らかなように、4 種類の蛍光分子の濃度比と、蛍光寿命の測定から得られた濃度比とは比例することから、4 種類の蛍光分子が混合された溶液でも、各蛍光分子の蛍光寿命に 1.0ns 以上の差（あるいは 1.1 倍以上の差）があれば、減衰曲線を解析することにより正確に濃度比を求めることができる。

表2

測定条件				ファイティング結果※		
サンプル	Pacific Blue (μM)	Lucifer Yellow (μM)	PyMPO (μM)	CNF (μM)	$\tau_1 B_1 : \tau_2 B_2$ <sup>*1</sup> (at 500nm)	$\tau_2 B_2 : \tau_3 B_3 : \tau_4 B_4$ <sup>*2</sup> (at 650nm)
	1	2	3	4		
A	0.5	0.5	0.2	2.5	71:29	17:26:57
B	0.5	0.5	0.2	0.5	75:25	31:42:27
C	0.1	0.5	0.05	2.5	36:64	19:7:74
						$\tau_1 B_1 : \tau_2 B_2 : \tau_3 B_3 : \tau_4 B_4$
						Pacific Blue : Lucifer Yellow : PyMPO : CNF
						2.4 : 1.0 : 1.5 : 3.4
						3.0 : 1.0 : 1.4 : 0.9
						0.6 : 1.0 : 0.4 : 3.9

\*1 蛍光測定用分光器を 500nm に設定し Pacific Blue と Lucifer Yellow の2成分によりファイティングを行った。

\*2 蛍光測定用分光器を650nmに設定しLucifer Yellow、PyMPO、CNF の3成分 によりファイティングを行った。

※ファイティング関数:  $B_1 \exp(-t/\tau_1) + B_2 \exp(-t/\tau_2) + \dots + \text{background}$

※Pacific Blue、Lucifer Yellow、PyMPO、CNF の固有の蛍光寿命は、

測定の結果それぞれ3.45ns ( $\tau_1$ )、6.17ns ( $\tau_2$ )、1.80ns ( $\tau_3$ )、0.65ns ( $\tau_4$ ) であった。

実施例 5：異なる蛍光寿命を有する複数の蛍光分子の定量測定と SNP のタイピングへの応用

実験操作として、Alexa Fluor 405、Marina Blue、PyMPO、Alexa Fluor 594、  
5 CNF が表 3 に示す割合で含まれるバッファー（組成：pH=7.6, 50 mM Tris-HCl, 1M NaCl, 30 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>）溶液 D、E、F を調製し、その蛍光減衰曲線を測定した。ここで、Alexa Fluor 405、Marina Blue、PyMPO、Alexa Fluor 594、CNF それぞれの単体が入った溶液からそれぞれの蛍光分子に固有の蛍光寿命を求めたところ、それぞれ蛍光寿命として、3.51ns、5.09ns、1.80ns、3.85ns、  
10 0.65ns を持つことが判明した。Alexa Fluor 405、Marina Blue、PyMPO、Alexa Fluor 594、CNF は、吸収スペクトルのピーク波長として、それぞれ 405nm、360nm、400nm、590nm、590nm を有する。また、蛍光スペクトルのピーク波長として、それぞれ 425nm、455nm、560nm、620nm、650nm を有する。

例として、表 3 のサンプル E を、分光器を用いて異なる 3 つの蛍光波長（450nm、  
15 520nm、650nm）で測定した蛍光減衰曲線を図 1 2 に示す。分光器のバンド幅は 8nm であった。

図 1 3 には、Alexa Fluor 405、Marina Blue、PyMPO、Alexa Fluor 594、CNF のそれぞれの単体を 408nm で励起した場合の規格化した蛍光スペクトルを示す。また、図 1 4 はサンプル E を 408nm で励起した際の蛍光スペクトルを表す。図  
20 1 4 のように、5 種類の蛍光分子が混合されると蛍光スペクトルを使って分離したり、定量することは非常に難しくなる。

一方、表 3 から明らかなように、5 種類の蛍光分子の濃度と、蛍光寿命の測定から得られた濃度比は比例することから、5 種類の蛍光分子が混合された溶液でも、各蛍光分子の蛍光寿命に 1.0ns 以上の差（あるいは 1.1 倍以上の差）があれば、減衰曲線を解析することにより正確に濃度比を求めることができる。  
25

以上の例は、例えば、2 箇所（2 つの部位）の SNP のタイピングを行う場合に  
応用できる。例えば、上記 Alexa Fluor 405 と Marina Blue をある特定部位の SNP に対応させ、Alexa Fluor 594 及び CNF を別の SNP 部位に対応さ

- せ、PyMPO を濃度既知の参照蛍光分子として利用する。このようにすれば、Alexa Fluor 405 と Marina Blue の蛍光強度比から SNP 部位のタイプ分け（ホモかヘテロか）が可能になり、同様に Alexa Fluor 594 及び CNF の蛍光強度比から別の SNP 部位のタイプ分けが可能になる。このように蛍光寿命が異なる複数の蛍光分子を利用することにより、SNP タイピングのマルチプレックス化が可能になり、コストと測定時間を大幅に削減することが可能である。
- 5

表3

サンプル	測定条件					フィットティング結果※			
	Alexa Fluor405 (μM)	Marina Blue (μM)	PyMPO (μM)	Alexa Fluor594 (μM)	CNF (μM)	$\tau_1 B_1 : \tau_2 B_2^{*1}$ (at 450nm)	$\tau_2 B_2 : \tau_3 B_3^{*2}$ (at 520nm)	$\tau_3 B_3 : \tau_4 B_4 : \tau_5 B_5^{*3}$ (at 650nm)	$\tau_1 B_1 : \tau_2 B_2 : \tau_3 B_3 : \tau_4 B_4 : \tau_5 B_5$
	1	2	3	4	5				
D	0.04	0.4	0.15	0.15	0.4	71:29	41:39	20:28:52	2.7 : 1.1 : 1.0 : 1.4 : 2.6
E	0.008	0.4	0.15	0.03	0.4	28:72	53:47	25:8:67	0.4 : 1.1 : 1.0 : 0.3 : 2.6
F	0.04	0.08	0.15	0.15	0.08	93:7	12:56	36:44:20	2.9 : 0.2 : 1.0 : 1.2 : 0.6

20

- \*1 蛍光測定用分光器を450nmに設定しAlexa Fluor405 とMarina Blue の2成分によりフィットティングを行った。
- \*2 蛍光測定用分光器を520nmに設定しAlexa Fluor405、Marina Blue、PyMPOの3成分によりフィットティングを行った。
- ここでは、Marina Blue と PyMPOの比を示す。
- \*3 蛍光測定用分光器を520nmに設定しPyMPO、Alexa Fluor594、CNF の3成分によりフィットティングを行った。

※フィットティング関数:  $B_1 \exp(-t/\tau_1) + B_2 \exp(-t/\tau_2) + \dots + \text{background}$

※Alexa Fluor405、Marina Blue、PyMPO、Alexa Fluor594、CNF の固有の蛍光寿命は、  
測定の結果それぞれ3.51ns ( $\tau_1$ )、5.09ns ( $\tau_2$ )、1.80ns ( $\tau_3$ )、3.85ns ( $\tau_4$ )、0.65ns ( $\tau_5$ ) であった。

### 産業上の利用可能性

- 本発明により、蛍光分子の定量方法、定量用試薬、定量装置及びその解析方法が提供される。本発明は、異なる蛍光寿命を持つ蛍光分子をプローブまたはターゲットとなる物質に標識し、低濃度の被検試料に対して高感度に検出することができるため、測定対象物質の検出又は定量用試薬として有用である。
- 5

## 請 求 の 範 囲

1. 被検試料中の蛍光分子を検出する方法であって、以下のステップ：
  - (a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間  
5 依存的に測定するステップ、及び
  - (b) 前記測定された蛍光強度を比較するステップ、  
を含むことを特徴とする前記方法。
2. 被検試料中の測定対象物質を検出する方法であって、以下のステップ：
  - (a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子で測定対象物質を標識するス  
10 テップ、
  - (b) 前記標識した蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定するス  
テップ、及び
  - (c) 前記測定された蛍光強度を比較するステップ、  
を含むことを特徴とする前記方法。
- 15 3. 被検試料中の測定対象物質のタイプを判別する方法であって、以下のス  
テップ：
  - (a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子で測定対象物質を標識する  
ステップ、
  - (b) 前記標識した蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定するス  
20 テップ、
  - (c) 前記測定された蛍光強度を比較するステップ、
  - (d) 前記比較された強度比を用いて前記測定対象物質のタイプを判別するス  
テップ、  
を含むことを特徴とする前記方法。
- 25 4. 前記複数種類の蛍光分子が、固有の蛍光寿命として 0.01 以上～1.0ns 未満を  
持つグループ、1.0 以上～2.0ns 未満を持つグループ、2.0 以上～3.0ns 未満を  
持つグループ、3.0 以上～4.0ns 未満を持つグループ、4.0 以上～5.0ns 未満を  
持つグループ、5.0 以上～6.0ns 未満を持つグループ及び 6.0 以上～7.0ns 以下



を持つグループからなる群から選択される異なる 3 つ以上のグループの各グループに属する蛍光分子を含む請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

5. 蛍光寿命が互いに 1.0ns 以上異なる蛍光分子を 3 つ以上含んでいることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

5 6. 蛍光寿命が互いに 1.1 倍以上異なる蛍光分子を 3 つ以上含んでいることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

7. 蛍光寿命が 30ns 以下であることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

8. 蛍光分子の少なくとも 1 種が既知の濃度を有するものである請求項 1 記載の方法。

9. 測定対象物質の少なくとも 1 種が既知の濃度を有するものである請求項 2 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

10. 測定対象物質がプローブ又はターゲットである請求項 2 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

15 11. プローブ又はターゲットが核酸である請求項 10 記載の方法。

12. 被検試料中の蛍光分子の解析方法であって、以下のステップ：

(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子の蛍光強度を時間依存的に測定し、次式 I：

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (I)$$

20

(式中、 $A_i$  は係数、 $t$  は時刻、 $\tau_i$  は蛍光寿命を表す。)

で示される蛍光寿命関数を作成するステップ、

(b) 前記関数を用いて蛍光強度を計算するステップ、

を含むことを特徴とする解析方法。

25 13. 測定対象物質の解析方法であって、以下のステップ：

(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子で測定対象物質を標識する

ステップ、

(b) 前記標識した蛍光分子の蛍光強度を時間依存的に測定し、次式 I:

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (\text{I})$$

5 (式中、 $A_i$  は係数、 $t$  は時刻、 $\tau_i$  は蛍光寿命を表す。)

で示される蛍光寿命関数を作成するステップ、

(c) 前記関数を用いて蛍光強度を計算するステップ、

を含むことを特徴とする前記方法。

1 4. 蛍光強度の計算が、係数  $A_i$  と蛍光寿命  $\tau_i$  との積を計算するものである請

10 求項 1 2 又は 1 3 記載の方法。

1 5. 遺伝子の判別方法であって、以下のステップ:

(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子で被検試料中の遺伝子を標識するステップ、

(b) 前記標識した蛍光分子の蛍光強度を時間依存的に測定し、次式 I:

$$f(t) = \sum_{i=1}^k A_i \exp(-t/\tau_i) \quad (\text{I})$$

15

(式中、 $A_i$  は係数、 $t$  は時刻、 $\tau_i$  は蛍光寿命を表す。)

で示される蛍光寿命関数を作成するステップ、

(c) 前記関数を用いて蛍光強度を計算することによって、当該蛍光分子の蛍光

20 強度を検出するステップ、及び

(d) 前記蛍光強度を指標として遺伝子のタイプを判別するステップ、

を含むことを特徴とする前記方法。

1 6. 蛍光強度の計算が、係数  $A_i$  と蛍光寿命  $\tau_i$  との積を計算するものである請

求項 1 5 記載の方法。

- 1 7. 少なくとも1種の蛍光分子の蛍光寿命が既知のものである請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。
- 1 8. 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子を含む、測定対象物質の検出用試薬又はキット。
- 5 1 9. 被検試料中の蛍光分子を検出する装置であって、以下の手段：  
(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定する手段、及び  
(b) 前記測定された蛍光強度を比較する手段、  
を含むことを特徴とする前記装置。
- 10 2 0. 被検試料中の測定対象物質の定量装置であって、以下の手段：  
(a) 固有の蛍光寿命を有する複数種類の蛍光分子で測定対象物質を標識する手段、  
(b) 前記標識した蛍光分子のそれぞれの蛍光強度を時間依存的に測定する手段、  
及び  
15 (c) 前記測定された蛍光強度を比較する手段、  
を含むことを特徴とする前記装置。

図 1

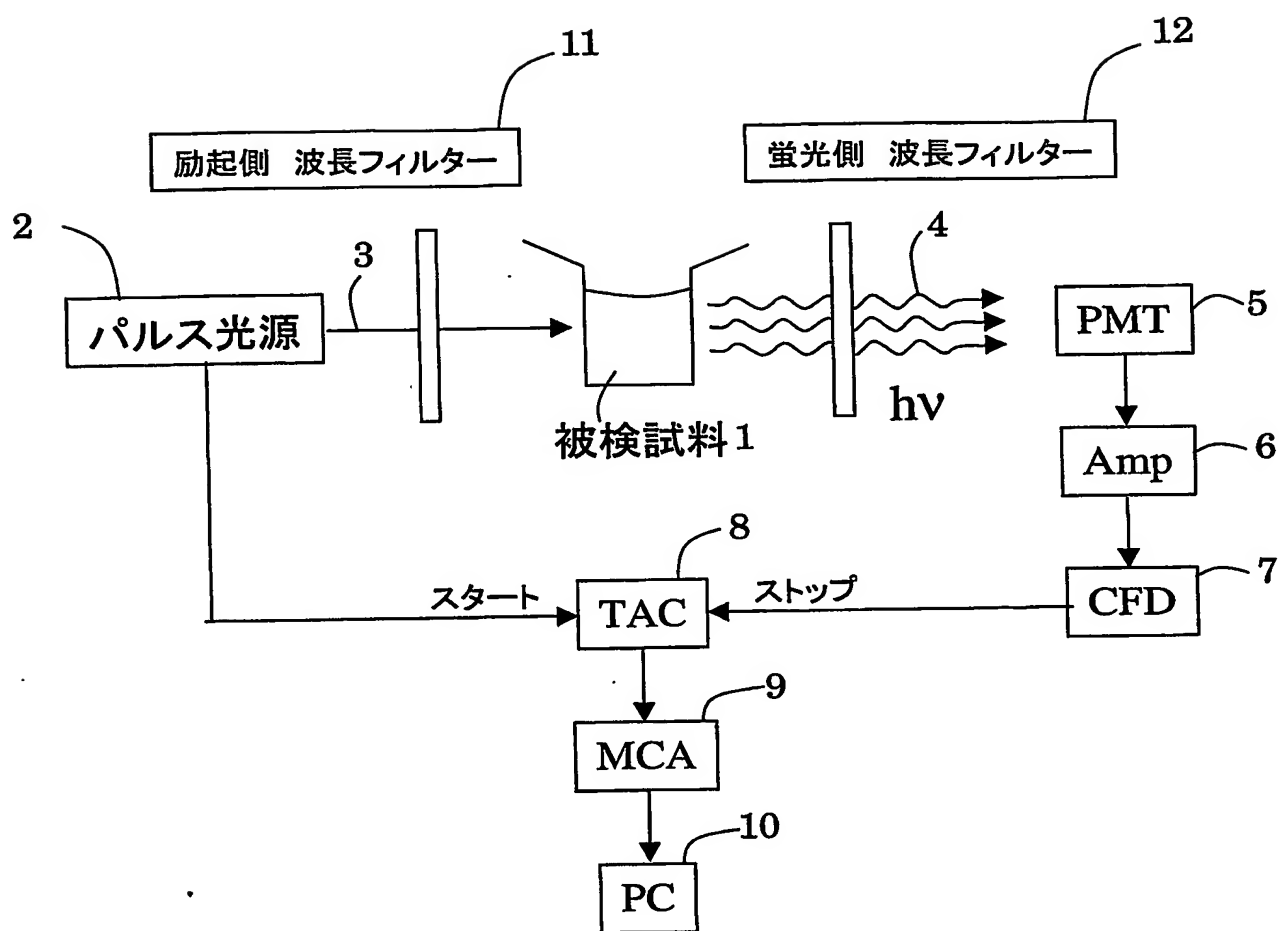


図 2

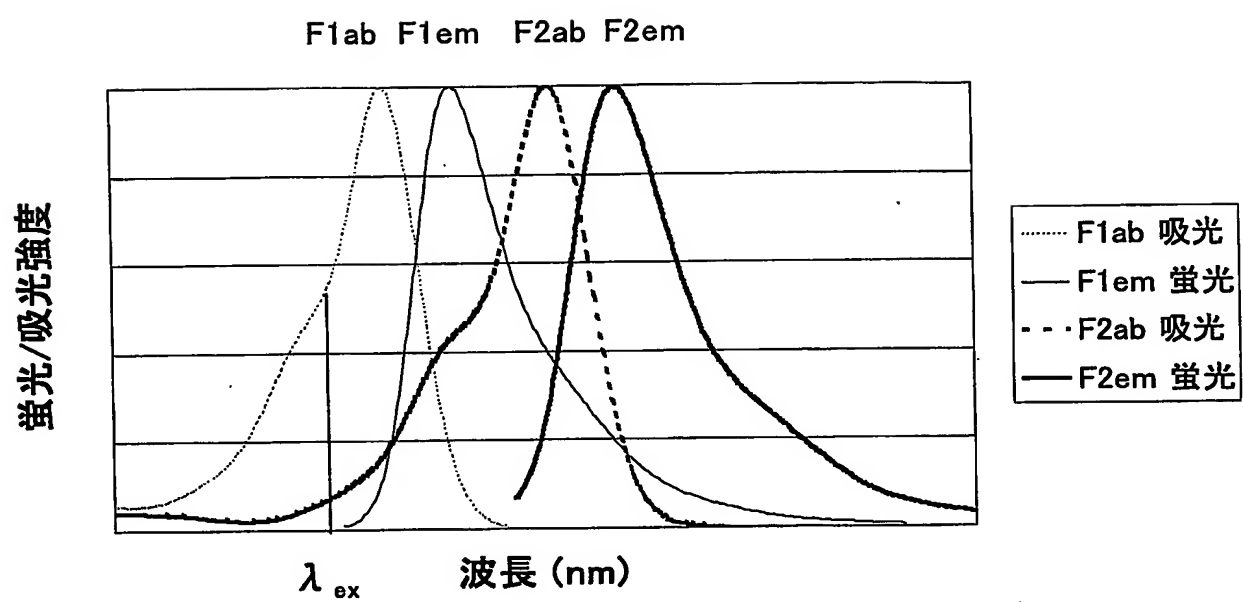


図 3

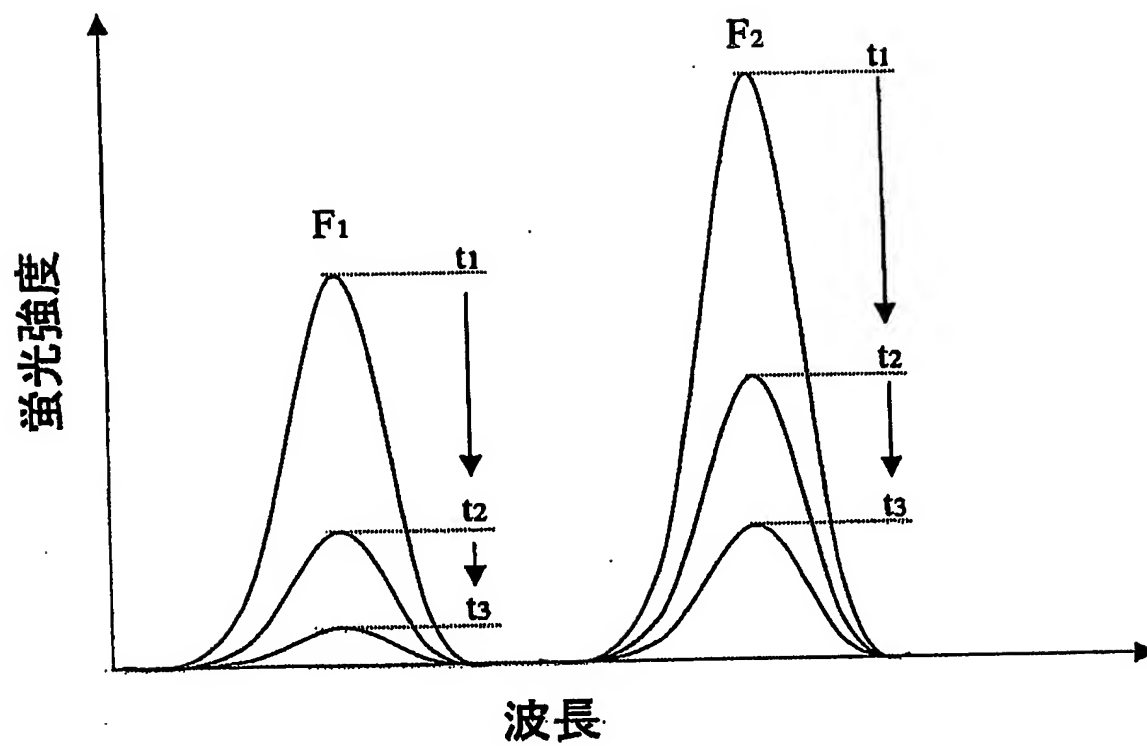


図 4

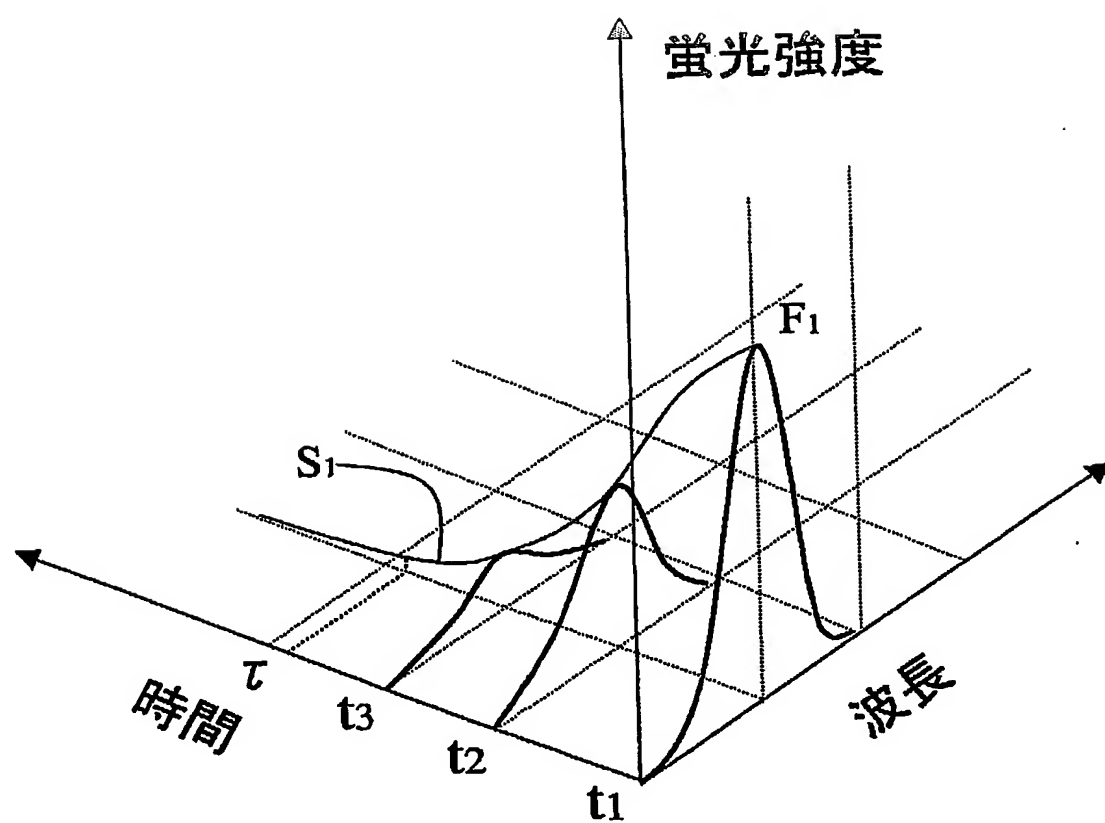
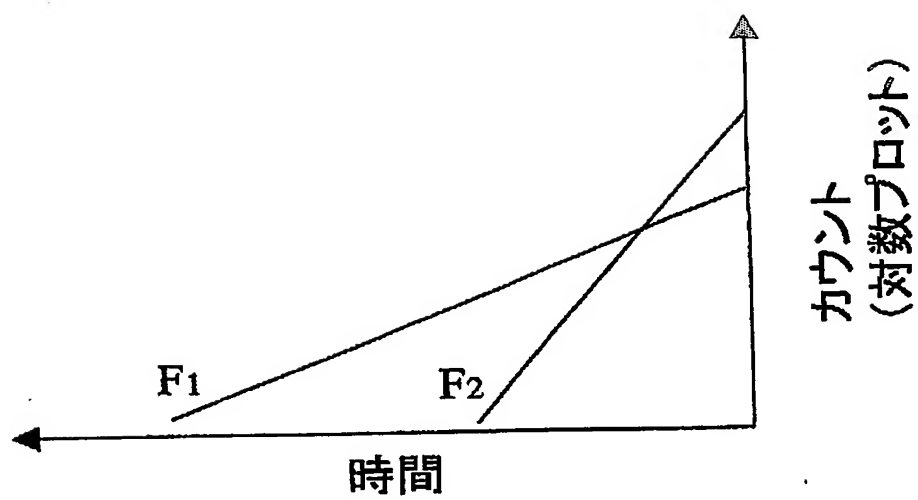


図 5

(a)



(b)

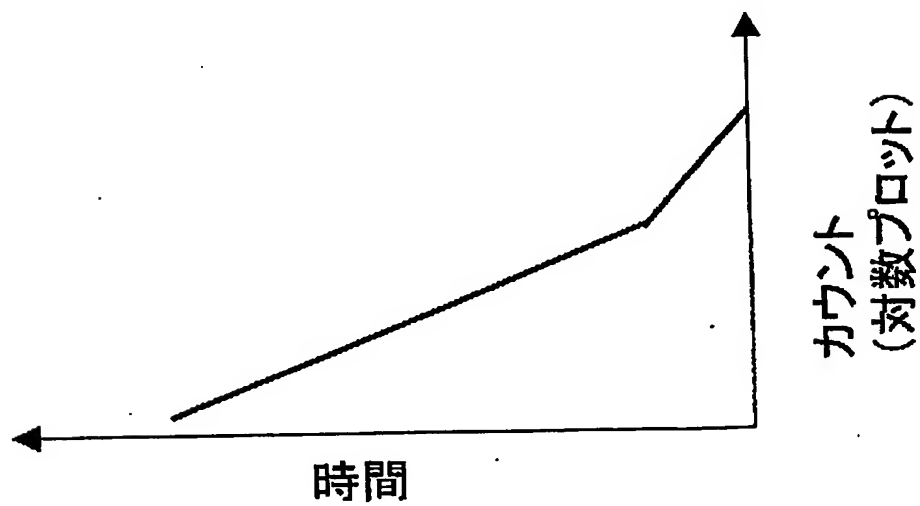
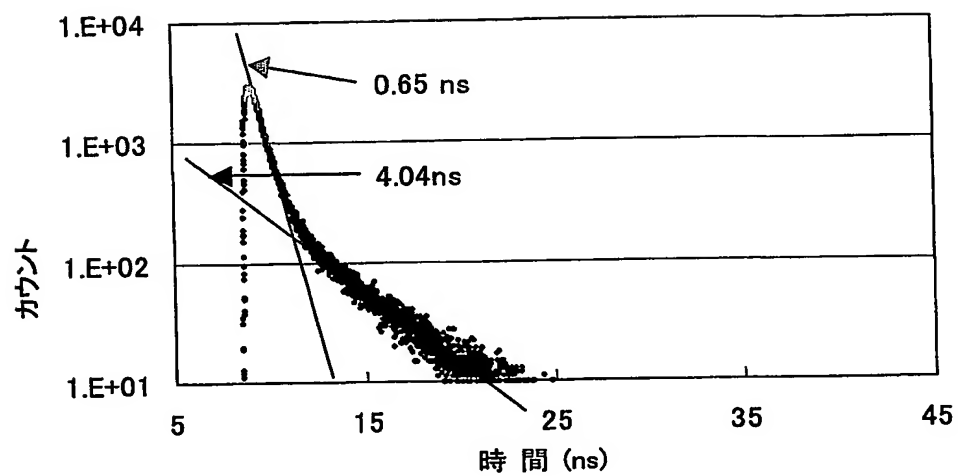




図 6

(a)



(b)

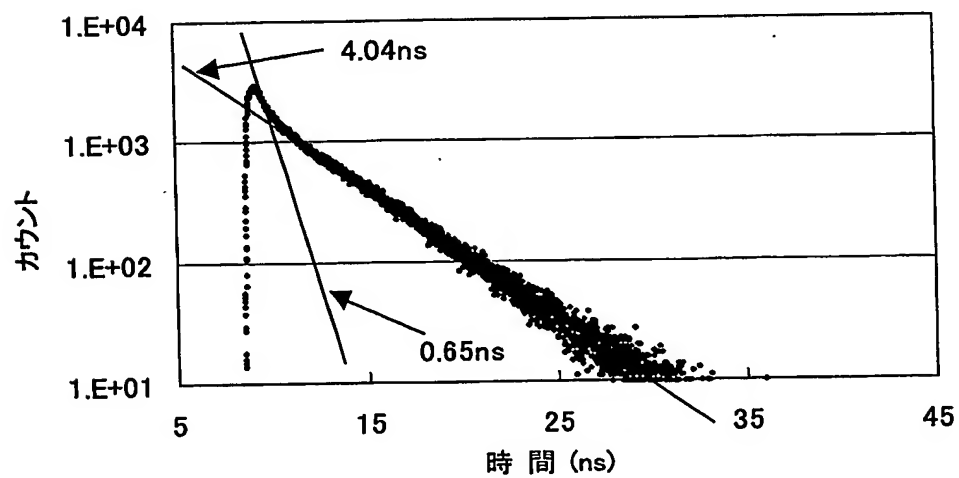


図 7

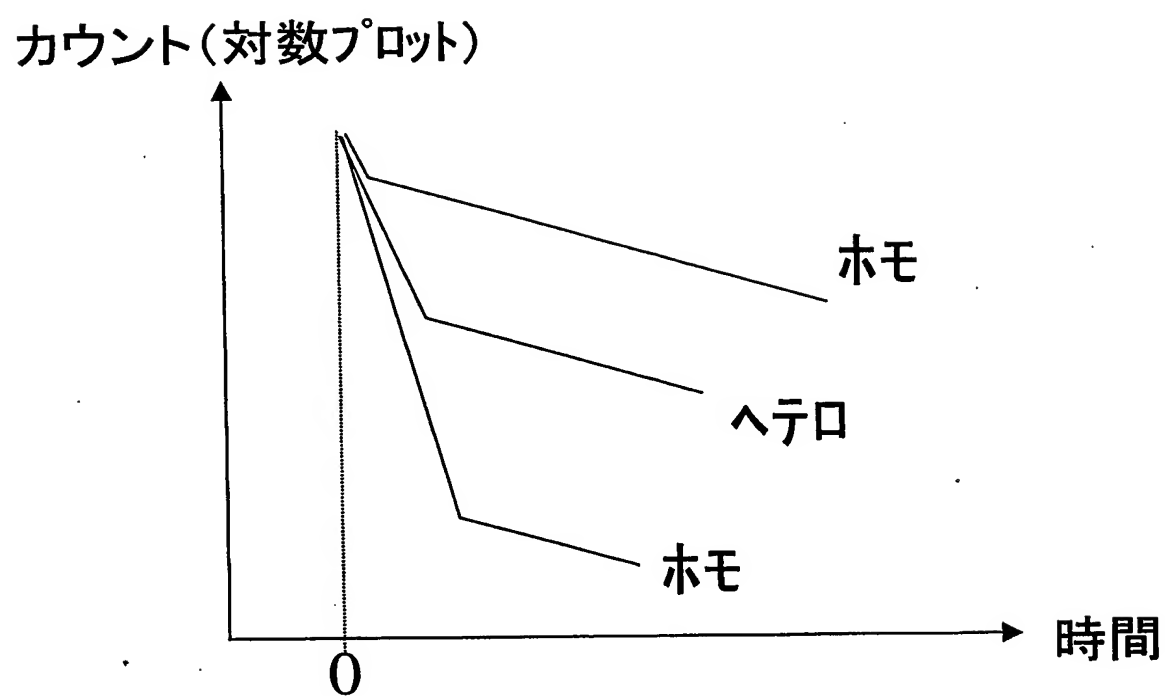


図 8

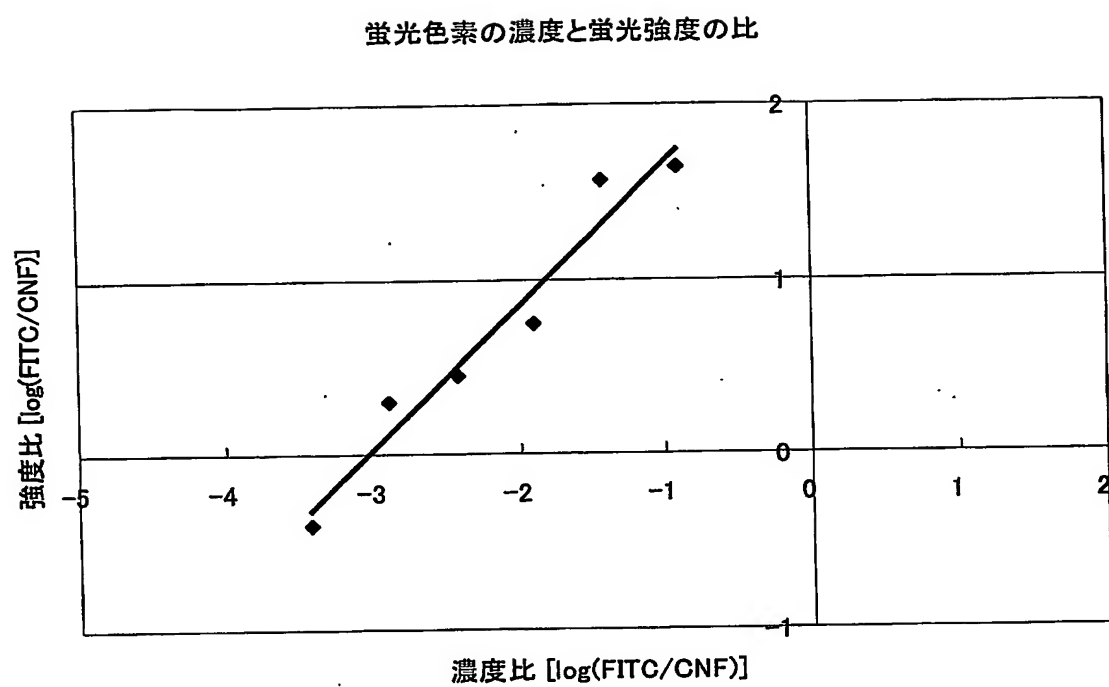


図 9

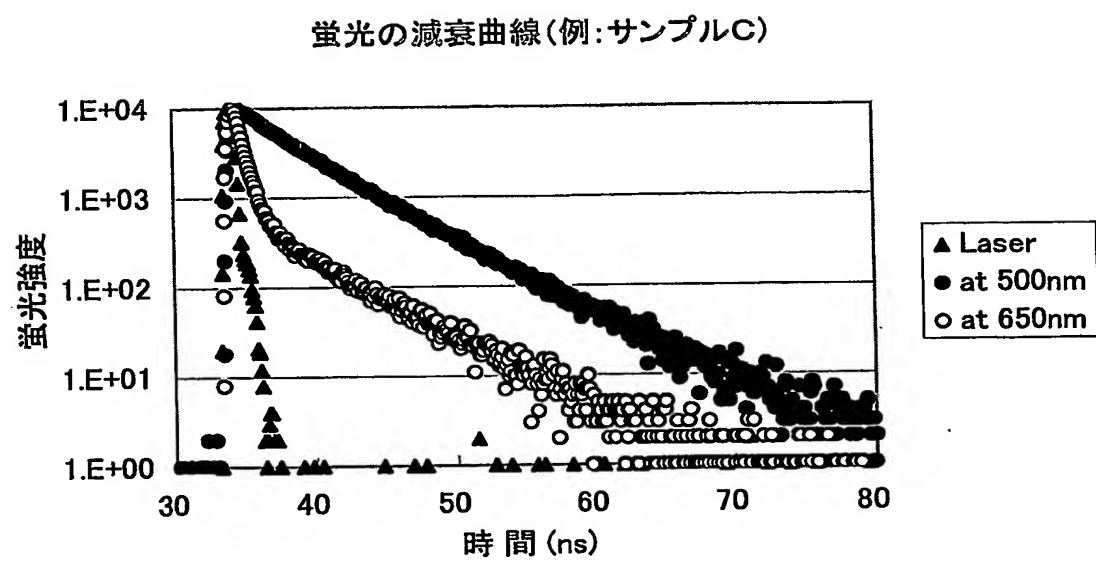


図 10

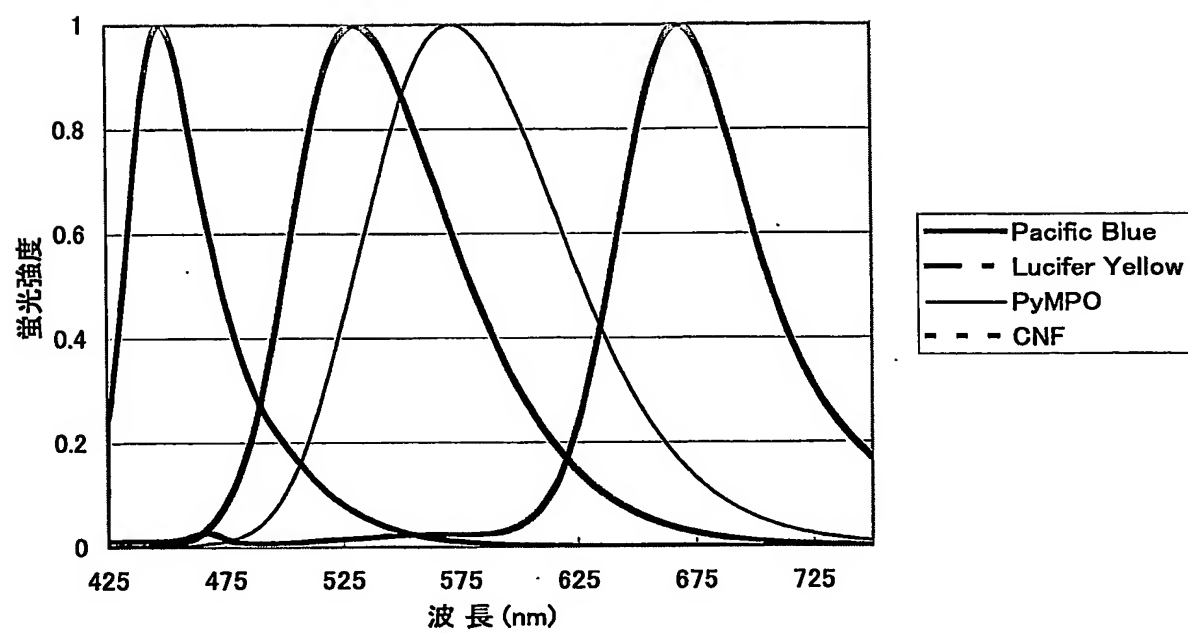


図 11

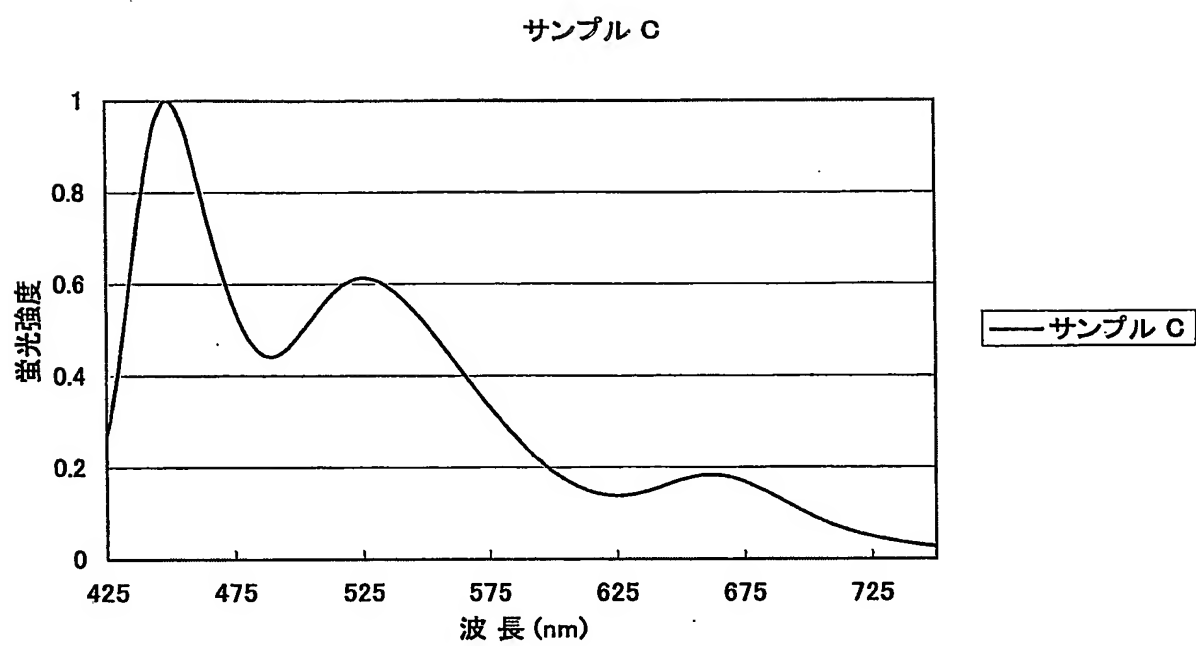


図 1 2

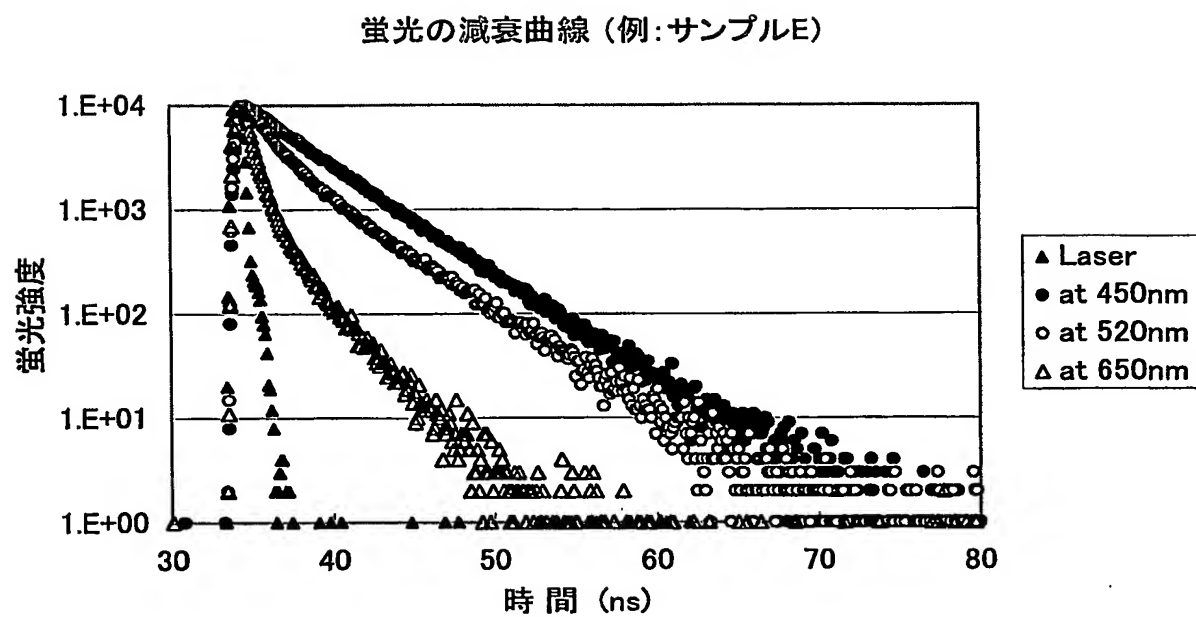


図 13

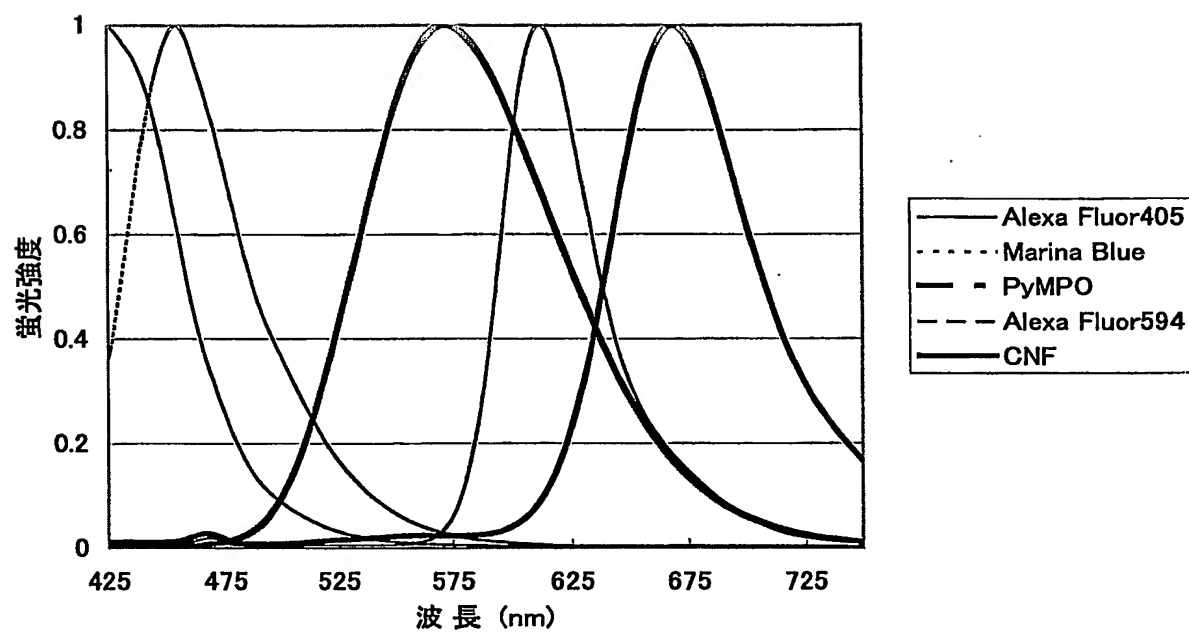
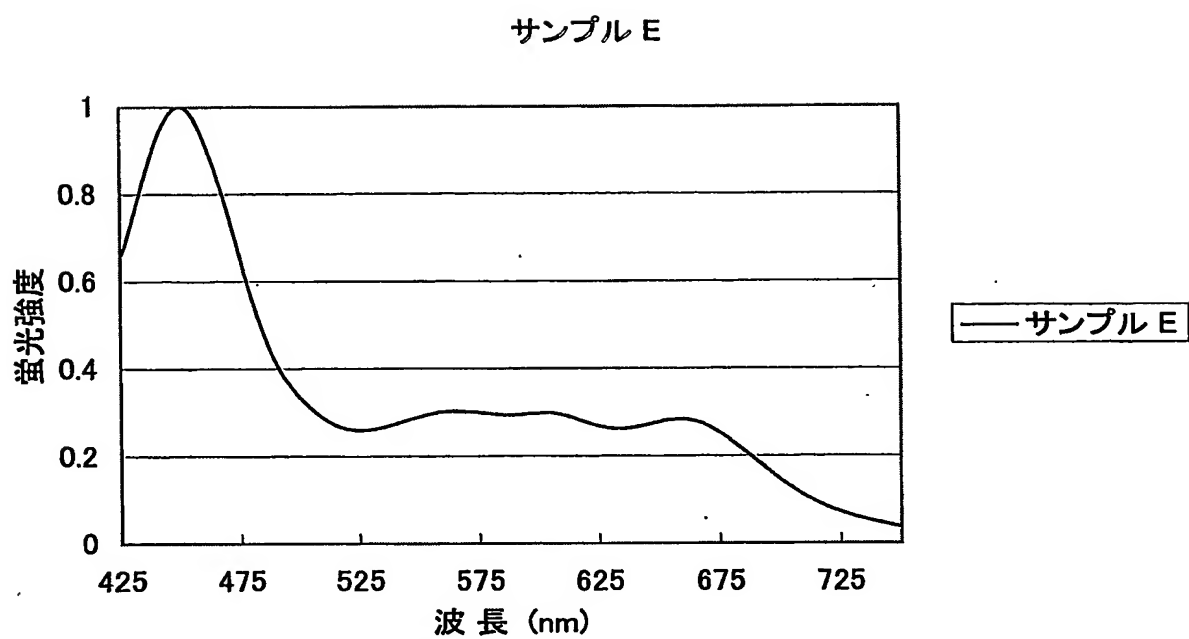




図 14



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004630

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> G01N21/64

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> G01N21/62-21/74, C21M1/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2004	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 5-126739 A (Hamamatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 21 May, 1993 (21.05.93), Full text; Fig. 1 & EP 556509 A & US 5322796 A1	1, 4-7, 10, 11, 19.
X	JP 6-148076 A (Hamamatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 27 May, 1994 (27.05.94), Par. Nos. [0079] to [0101]; Fig. 12 (Family: none)	1, 4-7, 10, 11, 19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 May, 2004 (07.05.04)Date of mailing of the international search report  
25 May, 2004 (25.05.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/004630

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2001-509612 A (Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg), 24 July, 2001 (24.07.01), Par. Nos. [0002] to [0005] & DE 19830596 A & WO 99/02974 A1 & EP 996854 A & EP 1008845 A	1-2, 4-7, 10, 11, 18-20